

文章编号: 1004-4353(2016)01-0039-06

妥布霉素糖基转移酶基因 *tobM2* 的研究

温淑平, 陈晖, 汪洋, 洪文荣*
(福州大学 生物科学与工程学院, 福建 福州 350116)

摘要: 为探索妥布霉素生物合成过程中糖基转移的作用,对糖基转移酶基因 *tobM2* 进行了阻断研究.以妥布霉素生物合成基因簇为模板,构建了同源重组质粒 pMB4,通过接合转移将质粒 pMB4 导入黑暗链霉菌 Tt-49,然后利用红霉素抗性筛选并经 PCR 验证,获得了一株基因 *tobM2* 被阻断的工程菌 TW402.发酵及代谢产物分析结果表明:工程菌总效价略有下降,约为出发菌株的 85%.TLC 检测与质谱分析显示,工程菌 TW402 主产安普霉素,并积累中间产物尼泊拉胺. *TobM2* 转化尼泊拉胺生成妥布霉素,*tobM2* 基因的缺失阻断了妥布霉素的生物合成,获得一株主产安普霉素工程菌.

关键词: 黑暗链霉菌;妥布霉素; *tobM2*; 基因阻断

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A

Research of glycosyltransferase gene *tobM2* in tobramycin

WEN Shuping, CHEN Hui, WANG Yang, HONG Wenrong*
(College of Biological Science and Technology, Fuzhou University, Fuzhou 350116, China)

Abstract: The glycosyltransferase gene *tobM2* was disrupted to study the reaction of glycosylation in the tobramycin biosynthesis. A recombinant plasmid pMB4 was constructed with tobramycin biosynthesis gene cluster as the template. Then, the plasmid pMB4 was transformed into *Streptomyces tenebrarius* Tt-49 by conjugation. A mutant strain TW402 was obtained by the gene *tobM2* was disrupted, screened and confirmed by erythromycin resistance and PCR amplification. Ferment and metabolite analysis showed that the total titer of mutant strain TW402 decreased slightly, which was about 85% of that of the wild-type strain. TLC detection and MS analyses indicated that the mutant strain TW402 mainly produced apramycin, and nebramine was accumulated. *TobM2* converted nebramine into tobramycin, and apramycin-producing engineering *bacterium* was obtained by disruption of *tobM2* gene, which blocked the tobramycin biosynthesis.

Keywords: *Streptomyces tenebrarius*; tobramycin; *tobM2*; gene dirrupted

0 引言

妥布霉素是临床上广泛使用的广谱抗生素,主要用于治疗革兰氏阴性菌引起的严重感染,其工业化生产菌株黑暗链霉菌还可生产安普霉素、氨甲酰妥布霉素和氨甲酰卡那霉素 B 等复合物.妥布霉素与卡那霉素、庆大霉素结构相似,均为 4,6-双取代 2-脱氧链霉胺类抗生素,其生物合成途径均涉及两步糖基转移.随着链霉菌遗传操作

技术发展,黑暗链霉菌次级代谢产物生物合成基因的相关研究也取得一定突破,妥布霉素与安普霉素的生物合成基因簇相继被克隆出来,并证实了两条基因簇是独立存在的,部分基因功能也得到证实^[1-4].倪现朴^[5]通过阻断安普霉素生物合成基因簇中的 *aprD4* 基因,证明 *aprD4* 同时参与安普霉素与妥布霉素生物合成过程中 3'位脱氧.林玉双等^[6]敲除妥布霉素生物合成基因 *tobS1-C*,

阻断了妥布霉素的生物合成,获得一株定向合成安普霉素的工程菌 T106. 李辉^[7]通过敲除基因 *tobZ* 和 *tobL*,证明 *tobZ* 为氨甲酰磷酸合成酶基因,参与妥布霉素 6"-氨甲酰化作用,而敲除基因 *tobL* 的菌株仍然能够合成氨甲酰妥布霉素,由此认为 *tobL* 不参与妥布霉素的氨甲酰化过程.

在妥布霉素生物合成过程中,理论推测第 1 个糖基转移酶基因 *tobM1* 编码 UDP-D-葡萄糖转移酶,将 D-葡萄糖转移至 2-脱氧链霉胺形成巴龙霉胺. 第 2 个糖基转移酶基因 *tobM2* 编码 6-葡萄糖转移酶,负责催化巴龙霉胺到卡那霉素 C 的糖基转移,而卡那霉素 C 是合成卡那霉素 B 和妥布霉素的前体. F. Flett 等^[8]通过将卡那链霉菌中推测的生物合成基因组到委内瑞拉链霉菌中异源表达,提出了卡那霉素生物合成两条平行途径,其分支点由糖基转移酶底物支配,并使用含有 *tobM2* 的黑暗链霉菌无细胞提取液与尼泊拉胺一起培养,证实 *tobM2* 可以催化尼泊拉胺形成妥布霉素. 本文在黑暗链霉菌中对妥布霉素糖基转移酶基因 *tobM2* 进行阻断研究,探索其是否存在其他功效,以此进一步证实 *tobM2* 基因的功能.

1 材料与方法

1.1 材料

1)质粒与菌株. 克隆载体 pMD19-T 购自宝生物工程(大连)有限公司,质粒 pME12(含红霉素抗性基因 *ermE*)、温敏型穿梭载体 pKC1139^[9]为本实验室保存. 质粒克隆宿主菌 *E.coli* Top10, 抗生素微生物检定菌枯草芽孢杆菌,大肠杆菌—链霉菌属间接合转移供体菌 *E.coli* ET12567(pUZ8002)^[10]为

本实验室保存. 出发菌株黑暗链霉菌 Tt-49 为本实验室选育^[11].

2)培养基与抗生素. 黑暗链霉菌菌丝体生长使用 YEME 培养基,接合转移使用 MS 培养基,斜面培养基、种子培养基以及发酵培养基参照文献^[12]. 抗生素微生物检定培养基 I 参照 2010 版《中华人民共和国药典》,大肠杆菌培养使用 LB 培养基,各培养基根据需要添加相应的抗生素. 本研究使用的抗生素的质量浓度分别为:氨苄青霉素 100 $\mu\text{g/mL}$,卡那霉素 25 $\mu\text{g/mL}$,氯霉素 25 $\mu\text{g/mL}$,安普霉素 50 $\mu\text{g/mL}$,红霉素 50 $\mu\text{g/mL}$,萘啶酮酸25 $\mu\text{g/mL}$.

3)试剂与工具酶. 限制性核酸内切酶、小牛肠碱性磷酸酶(CIAP)、T4 DNA Ligase、Taq DNA 聚合酶、DNA Marker 和 Proteinase K 均购自宝生物工程(大连)有限公司;DNA 凝胶回收试剂盒、RNase A 酶和溶菌酶购自生工生物工程(上海)股份有限公司;其他常规试剂为分析纯.

1.2 方法

1)引物设计. 以妥布霉素生物合成基因簇(GeneBank: AJ810851)为模板,利用生物信息学软件 Vector NTI 设计两对引物扩增 *tobM2* 基因上下游序列作为同源交换臂:P1 和 P2 用于扩增上游交换臂 M21,P3 和 P4 用于扩增下游交换臂 M22. 设计引物 P5 和 P6,P7 和 P8 用于 *tobM2* 基因阻断突变株的筛选与鉴定. 所有引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物位置与扩增片段长度如图 1 所示,引物序列及其限制性酶切位点见表 1.

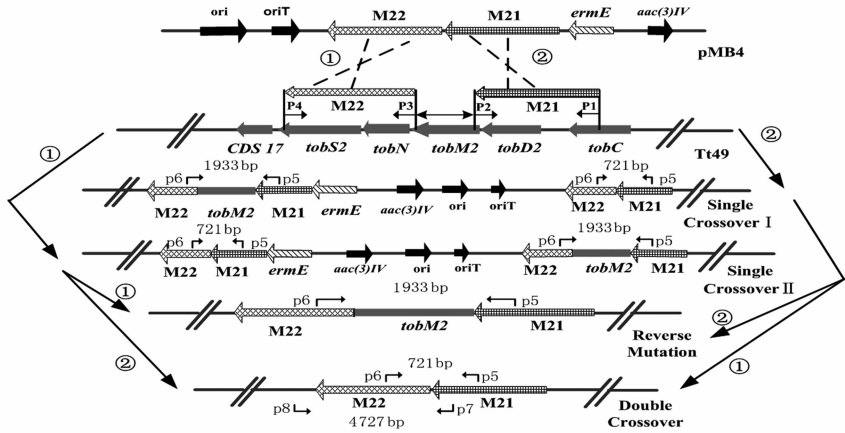


图 1 质粒 pMB4 与 Tt-49 基因组 DNA 同源重组示意图

表 1 本研究所用引物及其酶切位点

引物	序列	限制酶
P1	5'-GAATTC	CCATGCTCGACTCGGTGC-3' <i>Eco</i> R I
P2	5'-TCTAGA	AGAACGGGGTGAGCGCCA-3' <i>Xba</i> I
P3	5'-TCTAGA	CGGACCAGCTCACGGACA-3' <i>Xba</i> I
P4	5'-AAGCTT	GAGCAGGGAGTGGTGGAC-3' <i>Hind</i> III
P5	5'-TGAGGAGATCACGACCGAGG-3'	
P6	5'-CACCAGTTCCGACTCGTCGT-3'	
P7	5'-ACGCCGAAGTCTCAACA-3'	
P8	5'-ATGTCGGTGTCTGCTCATCTG-3'	

2) DNA 分子操作. PCR、质粒 DNA 抽提、大肠杆菌感受态细胞的制备、酶切、酶连和转化等常规分子克隆操作参照文献[13]. 黑暗链霉菌基因组 DNA 提取和接合转移参照文献[12].

3) 发酵及产物提取分析. 选取产孢丰富的优质斜面, 刮取适量孢子接于 50 mL 种子培养基, 在 280 r/min 和 37 ℃ 下振荡培养 18~20 h; 以 10% 的接种量接种于 50 mL 发酵培养基, 在 280 r/min 和 37 ℃ 下振荡培养 4~5 d 放瓶. 发酵液生物效价测定参照 2010 版《中华人民共和国药典》, 发酵产物提取精制参照文献[14]. 精制产品采用硅胶 GF254 薄层层析检测, 展开剂为正丙醇-甲醇-25% 氨水 (2:2.5:2.3, 体积比)^[15]. 采用安捷伦 6520 四极杆-飞行时间质谱仪进行组分的精确测定, 数据分析软件为 Agilent MassHunter(B. 04. 00).

2 结果与分析

2.1 重组质粒 pMB4 的构建

以黑暗链霉菌 Tt-49 基因组 DNA 作为模板, 利用引物 P1/P2 扩增上游交换臂 M21(2 024 bp), P3/P4 扩增下游交换臂 M22(2 004 bp). 将交换臂 M21 和 M22 分别克隆至 pMD19-T 载体, 得到质粒 pMB1 和 pMB2. 质粒 pMB1 经(*Eco*R I / *Xba*I) 双酶切, 电泳回收 M21 片段; 质粒 pMB2 经(*Xba*I / *Hind*III) 双酶切, 电泳回收 M22 片段; 穿梭载体 pKC1139 经(*Eco*R I / *Hind*III) 双酶切后, 电泳检测回收长片段. 将回收的 3 个片段进行酶连, 再转化至 *E.coli* Top10 感受态细胞, 经筛选阳性克隆后获得质粒 pMB3.

用 *Eco*R I 单酶切质粒 pME12, 回收红霉素抗性基因; 同样用 *Eco*R I 单酶切质粒 pMB3, 回

收长片段, 将两个回收片段酶连, 转化至 *E.coli* Top10 感受态细胞, 经筛选阳性克隆后获得重组质粒 pMB4(图 2).

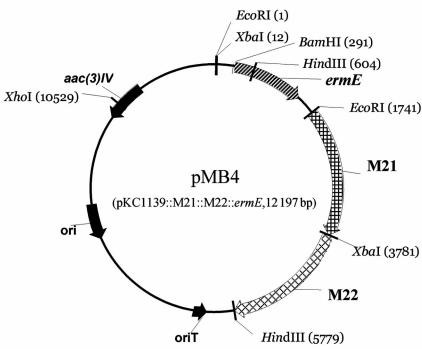
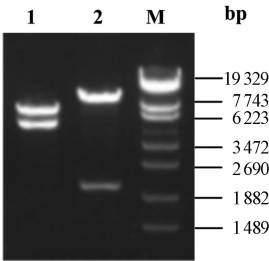


图 2 重组质粒 pMB4 图谱

对重组质粒 pMB4 进行酶切验证, 根据质粒图谱分析表明, pMB4 经 *Hind*III 单酶切后得到 5 175 bp 和 7 022 bp 2 条带; 经(*Xho*I / *Bam*H I) 双酶切后得到 10 238 bp 和 1 959 bp 2 条带. 酶切电泳检测见图 3, 其值均与理论值吻合, 由此证明构建的重组质粒确为 pMB4.



M. λ -*Eco*T14 I digest DNA Marker; 1. pMB4/*Hind*III; 2. pMB4 *Xho*I/*Bam*H I

图 3 重组质粒 pMB4 的酶切电泳检测

2.2 接合转移与单交换突变株的筛选

将重组质粒 pMB4 转化至 *E.coli* ET12567 (pUZ8002), 得到接合转移供体菌 *E.coli* ET12567 (pUZ8002/pMB4). 选取长势良好的黑暗链霉菌 Tt-49 孢子斜面, 将其制备成孢子悬液作为接合转移受体菌. 参照接合转移方法将供体菌与孢子悬液按 1:1 体积混合, 梯度稀释涂布于 MS 培养基, 于 37 ℃ 培养 18~20 h, 用 800 μ L 含红霉素和萘啶酮酸水溶液 (终浓度分别为 50 μ g/mL 和 25 μ g/mL) 覆盖, 然后继续培养 3~4 d, 直到长出接合子.

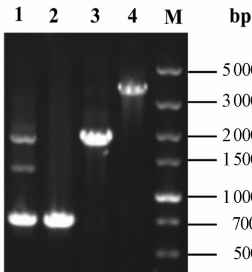
质粒 pMB4 为温敏型自杀重组质粒, 培养温度高于 34 ℃ 时, 该质粒不能在黑暗链霉菌中自主

复制. 在红霉素作用下, 只有将质粒 pMB4 整合至 Tt-49 基因组的接合子它才能生长. 选取一株长势较好的接合子, 根据同源重组示意图(图 1), 设计引物 P5/P6 对其基因组 DNA 进行 PCR 验证, 如图 4 所示. 电泳检测到有 1 933 bp 和 721 bp 两条带, 与理论值相符, 由此可证明其为单交换突变株, 命名为黑暗链霉素菌 TW401.

2.3 *TobM2* 基因阻断突变株的筛选与验证

由于单交换菌株 TW401 仍含有同源片段, 易发生第 2 次同源重组, 形成 *tobM2* 被阻断的双交换突变株或回复突变株; 因此, 将菌株 TW401 转接至斜面培养基, 连续培养 2 代后分离单菌落, 影印到含红霉素抗性平板和无抗生素的平板上. 培养后, 筛选得到 9 株在添加红霉素的平板上不生长而在无抗生素的平板上生长的红霉素敏感菌株, 这些红霉素敏感菌株可能为双交换突变株也可能为回复突变株. 根据同源重组示意图(图 1), 可利用引物 P5/P6 进行 PCR 验证, 回复突变株 PCR 产物只有 1 933 bp 1 条带, 双交换突变株的 PCR 产物只有 721 bp 1 条带.

经 PCR 筛选, 将得到一株 PCR 产物只有 721 bp 1 条带的菌株, 初步确认为 *tobM2* 基因阻断突变株. 为进一步确认, 设计引物 P7/P8 进行 PCR 鉴定, 电泳检测 PCR 产物只有 4 727 左右的 1 条带, 与理论值相符, 电泳检测见图 4. 经测序比对, 确定该菌株即为 *tobM2* 基因缺失突变株, 命名为黑暗链霉素菌 TW402.



M. DL5000 bp; 1. TW401/P5/P6; 2. TW402/P5/P6; 3. Tt-49/P5/P6; 4. TW402/P7/P8

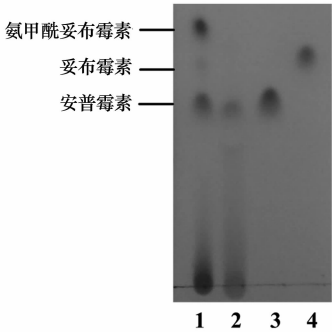
图 4 工程菌基因组 DNA PCR 产物电泳图

2.4 TW402 菌株的发酵与产物分析

在相同条件下, 对工程菌 TW402 和出发菌 Tt-49 进行 5 次摇瓶发酵. 对发酵液初步处理后, 进行抗生素效价测定, 结果得到工程菌 TW402 总效价均值为 3 500 U/mL, 约为 Tt-49 的 85%.

对出发菌 Tt-49 和工程菌 TW402 的发酵产物提取后, 进行 TLC 分析, 结果见图 5, 出发菌 Tt-49 的发酵产物显示有 3 个主斑点, 其中 2 个斑点颜色较深, 分别为氨甲酰妥布霉素和安普霉素, 较浅的斑点组分为妥布霉素; 而工程菌 TW402 只检测到安普霉素斑点.

采用 MS 对 Tt-49 和 TW402 的发酵产物进行精确测定, 结果见图 6. Tt-49 检测到 3 个组分, 分别为妥布霉素(m/z 468.2703)、氨甲酰妥布霉素(m/z 511.2765)和安普霉素(m/z 540.2922); 工程菌 TW402 检测到 m/z 540.2834 的安普霉素分子离子峰和 m/z 270.6451 的安普霉素二价离子峰, 以及 m/z 163.1064 和 m/z 307.1954 分子离子峰, 分别为中间产物 2-脱氧键霉素(2-DOS)与尼泊拉胺, 但未检测到预期的巴龙霉素分子离子峰.



1. Tt-49; 2. TW402; 3. 安普霉素标准品; 4. 妥布霉素标准品

图 5 工程菌 TW402 代谢产物的 TLC 分析

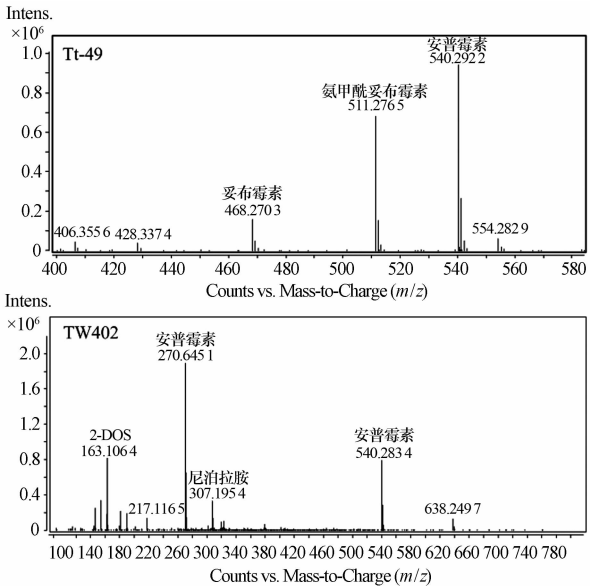


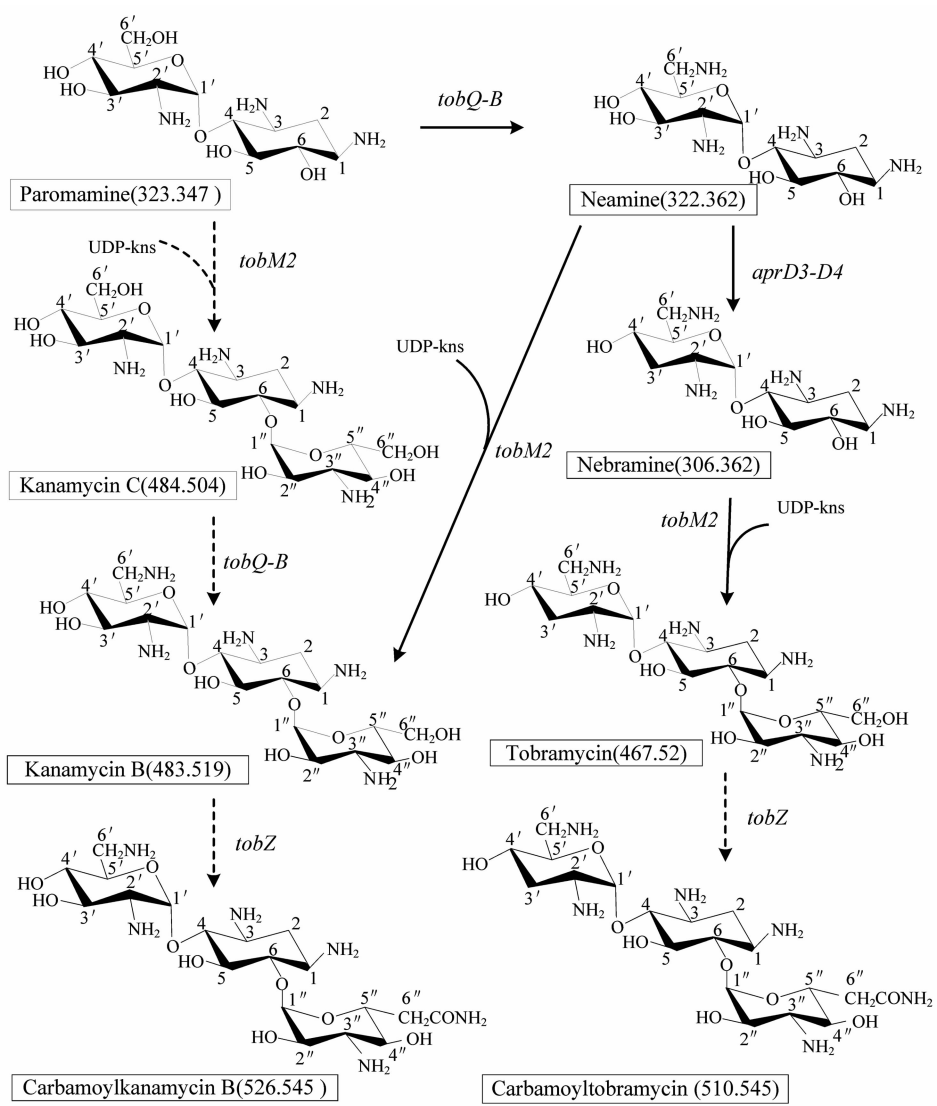
图 6 工程菌 TW402 代谢产物的 MS 分析

3 讨论与结论

本研究对黑暗链霉菌 Tt-49 中妥布霉素生物合成基因簇上的糖基转移酶基因 *tobM2* 进行框内敲除,获得工程菌 TW402。工程菌 TW402 主要产物安普霉素,与出发菌 Tt-49 相比,其生长性状并无明显差异。对菌株 TW402 的发酵产物进行分析发现,其效价略有下降,约为 3 500 U/mL。与之前林玉双^[6] 敲除 *tobS1-C* 的工程菌 T106 相比,工程菌 TW402 发酵单位稍高一些,这可能是由于菌株 T106 基因缺失片段长度(2 484 bp)比菌株 TW402 长,基因破坏较大,影响了突变株总体发酵水平。就此而言,TW402 更适合作为具有

生产潜力的安普霉素工程菌。

此外,经 MS 检测发现,工程菌发酵产物含有尼泊拉胺,且妥布霉素生物合成完全被阻断。由此,可以认为 *tobM1* 基因编码的糖基转移酶不能替代 *tobM2* 催化巴龙霉素生成卡那霉素 C,并且巴龙霉素可经 C6' 位转氨合成,再经 C3' 位脱氢,合成尼泊拉胺,最后经 *tobM2* 糖基转移形成妥布霉素。早期推测的在妥布霉素生物合成过程,中巴龙霉素先形成假三糖,然后对 C6' 和 C3' 位进行修饰,再经 C6' 转氨形成卡那霉素 B。本研究根据前人及本文的实验结果,对黑暗链霉菌中妥布霉素生物合成途径进行重新梳理,推测出了一条新的妥布霉素生物合成平行途径,如图 7 所示。



早期推测 — — — 最新补充 ———

图 7 新推测的妥布霉素的生物合成平行途径

参考文献:

- [1] Kharel M K, Subba B, Lee H C, et al. An approach for cloning biosynthetic genes of 2-deoxystreptamine-containing aminocyclitol antibiotics: isolation of a biosynthetic gene cluster of tobramycin from *Streptomyces tenebrarius* [J]. Biotechnology Letters, 2003, 25(24):2041-2047.
- [2] Kharel M K, Basnet D B, Lee H C, et al. Isolation and characterization of the tobramycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces tenebrarius* [J]. FEMS Microbiology Letters, 2004, 230(2): 185-190.
- [3] Flatt P M, Mahmud T. Biosynthesis of aminocyclitol-aminoglycoside antibiotics and related compounds[J]. Natural Product Reports, 2007, 24(2): 358-392.
- [4] Kudo F, Eguchi T. Biosynthetic genes for aminoglycoside antibiotics[J]. The Journal of Antibiotics, 2009, 62(9):471-481.
- [5] 倪现朴. 黑暗链霉菌 *aprD3* 和 *aprD4* 基因的研究及卡那霉素 B 高产菌株的构建[D]. 沈阳:沈阳药科大学, 2011.
- [6] 林玉双, 洪文荣. 黑暗链霉菌 *tobS1-C* 基因缺失突变株的构建[J]. 中国药科大学学报, 2012, 43(1): 92-96.
- [7] 李辉. 黑暗链霉菌次级代谢产物生物合成基因的研究[D]. 福州:福州大学, 2013.
- [8] Flett F, Mersinias V, Smith C P. High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting streptomycetes[J]. FEMS Microbiology Letters, 1997, 155(2):223-229.
- [9] Paranthaman S, Dharmalingam K. Intergeneric conjugation in *Streptomyces peucetius* and *Streptomyces sp.* strain C5; chromosomal integration and expression of recombinant plasmids carrying the *chiC* gene [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(1):84-91.
- [10] 林玉双, 洪文荣, 林烨, 等. 氨甲酰妥布霉素高产菌株选育及其发酵特性研究[J]. 中国抗生素杂志, 2008, 33(7):442-445.
- [11] Kieser T, Bibb M J, Mark J, et al. Practical Streptomyces Genetics [M]. Norwich, England: The John Innes Foundation, 2000:249-250.
- [12] Sambrook J F, Russell D W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001:27-99.
- [13] Hong W R, Yan S D. Engineering *Streptomyces tenebrarius* to synthesize single component of carbamoyltobramycin [J]. Lett Appl Microbiol, 2012, 55(1):33-39.
- [14] Ni X P, Li D, Yang L H, et al. Construction of kanamycin B overproducing strain by genetic engineering of *Streptomyces tenebrarius* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 89: 723-731.
- [15] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [M]. 2 部. 北京:中国医药科技出版社, 2010.